

膀胱内挿入カテーテル材料表面への細菌および結晶付着に関する研究

金沢大学医学部泌尿器科学講座 (主任: 久住治男教授)

布施 春 樹

(平成4年11月13日受付)

尿道留置カテーテル材料表面に細菌および結晶が付着する過程, およびカテーテル材料挿入中の膀胱壁の組織学的変化についてウイスターラットを用いて実験的に研究した。直径3mm, 厚さ1mmの円盤(ラテックス, シリコン, ポリビニールまたはヘパリン徐放性ポリビニール)をラット膀胱内に観血的に挿入した。それぞれの円盤は, 滅菌して挿入した群(滅菌群)と腎感染結石患者より分離した *Proteus mirabilis* 菌液を塗布して挿入した群(菌塗布群)に分けて検討した。挿入1, 3, 5, 7, 14および28日後に膀胱および円盤を摘出し, 円盤表面は細菌学的検索を施行するとともに, 走査型電子顕微鏡にて観察した。膀胱壁は, ヘマトキシリン-エオジン染色およびアルシアン青染色にて検索した。走査型電子顕微鏡による検索では, 滅菌群において, ラテックス円盤で3日後, シリコンおよびポリビニール円盤で5日後よりフィブリン様物質が付着し始め, フィブリン様物質の付着増加に伴い, 結晶成分の付着増加が観察された。一方, ヘパリン徐放性ポリビニール円盤においては, フィブリン様物質の付着は少量であった。蛍光抗体法を用いた検索から, フィブリン様物質の多くはフィブリンと同定された。ヘパリン徐放性ポリビニール円盤表面での結石形成率および結石重量は他の円盤に比し有意に低値を示した ($p < 0.05$)。走査型電子顕微鏡による検索では, 菌塗布群において, 3日後よりいずれの材料にも, フィブリン, 細菌, 結晶が付着し, いわゆるバイオフィルムの形成が円盤表面に観察された。膀胱壁の組織学的検討では, 各群ともにムチン層が円盤挿入直後より消失し, 挿入中は再生されなかった。以上より, カテーテル表面に早期に付着するフィブリンが, 結晶成分および細菌の付着増加に大きく関与しているものと考えられた。ヘパリンがフィブリンの付着を妨げることにより, ヘパリン徐放性材料表面のバイオフィルム形成および結石形成が減少すると考えられた。さらに, バイオフィルム形成に加えて, 膀胱壁のムチン層の消失が, 留置カテーテル患者における難治性尿路感染発症の一要因と考えられた。

Key words indwelling urinary catheter, bacterial and crystal adherence, heparin, fibrin, mucin layer

人口の高齢化や医療の高度化に伴い, 長期間尿路留置カテーテルにて尿路管理されている患者数は増加しており, 我が国では年間約600万本のカテーテルが使用されているものと推定されている。近年, 留置カテーテル材料の改良, および管理方法に種々の工夫がなされている^{1)~3)}が, 長期留置に伴う難治性尿路感染症⁴⁾や結石形成⁵⁾などの重要な合併症があるにもかかわらず, これらの問題点について十分に解明されているとはいえない。そのため, 著者はこの問題をカテーテルへの細菌および結晶の付着という面から解明すべく, ラットを用いて実験的研究を行った。

材料および方法

I. 実験動物

体重200g前後のウイスター系雌性ラット(三協ラボサービス, 富山)を使用した。飼育は固形飼料(オリエンタル酵母工業, 東京)を用い, 室温22℃, 湿度60%の飼育室で行い, 自由飲水とした。

II. カテーテル材料

ラテックス, シリコンは富士ラテックス社(東京), ポリビニール, ヘパリン徐放性ポリビニールは東レ・メディカル(東京)より提供を受けた。

III. 細菌浮遊液

両側鉗型腎結石(結石成分, 磷酸マグネシウムアンモニウム(magnesium ammonium phosphate, MAP)患者からの臨床分離 *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) 株⁶⁾を, ハートインフュージョンブイヨン(heart infusion broth, HI)(栄研化学, 東京)で37℃, 18時間振盪培養後, 比濁法にて 10^8 コロニー形成単位(colony-forming unit, cfu)/mlになるように菌液を調整した。

IV. カテーテル留置モデルの作成法

ラテックス, シリコン, ポリビニールおよびヘパリン徐放性ポリビニールをそれぞれ直径3mm, 厚さ1mmの円盤とし, これらを24時間エチレンオキシドガスにて滅菌した。*P. mirabilis* 菌液に, 滅菌円盤を浸したものを, 菌塗布円盤とした。エーテル麻酔下に, 膀胱を露出し, 膀胱頂部に約3mmの

Abbreviations: cfu, colony-forming unit; HE, hematoxylin-eosin; HI, heart infusion broth; HPa, aseptic heparinized polyvinyl; HPb, bacterial heparinized polyvinyl; La, aseptic latex; Lb, bacterial latex; MAP, magnesium ammonium phosphate; Pa, aseptic polyvinyl; Pb, bacterial polyvinyl; PBS, phosphate-buffered saline; *P. mirabilis*, *Proteus mirabilis*

切開を加えた後、滅菌円盤または菌塗布円盤を膀胱内に挿入した。

V. 病理組織学的検索

円盤挿入1, 3, 5, 7, 14および28日後に、ネンブータル麻酔下にてラットを屠殺し、膀胱を円盤とともに摘出した。膀胱を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定後、ヘモトキシリン・エオジン (hematoxylin-eosin, HE) 染色および膀胱壁ムチン層の検索のためのアルシアン青染色にて組織学的に検索した。

VI. 尿 pH

膀胱摘出直前に膀胱尿を採取し、pH メーター F-8DP (堀場, 東京) にて尿 pH を測定した。なお、無処置ラットの膀胱尿を採取し、対照とした。

VII. 細菌学的検索

前述の膀胱尿の一部をウリカルト (第一化学薬品, 東京) にて37℃で一夜培養し、エンテロチューブⅡ (ロシュ, 東京) にて細菌の分離, 同定を行った。また、摘出した円盤は結石付着の有無を確認し、付着した結石の一部を碎分し、HI にて37℃で一夜振盪培養後、ウリカルトに塗布しエンテロチューブⅡにて細菌の分離, 同定を行った。

VIII. 結石の重量測定および成分分析

付着結石は自然乾燥後、微量重量計 ㉔-DTP (島津, 京都) を用いその重量を測定した。結石成分分析は、赤外分光光度計 IR-435 (島津) を用い KBr 錠剤法¹⁰⁾ にて行った。

IX. 走査型電子顕微鏡による観察

摘出した円盤は、2.4%グルタルアルデヒドにて1時間固定し、2%オスミウム酸による後固定を加え、エタノール系列により脱水した。次いで酢酸イソアミル下に臨界点乾燥器 HCP 型 (日立, 東京) にて、臨界点乾燥を施行し、白金-パナジウム蒸着後、走査型電子顕微鏡 HFS-2 または S-900 型 (日立) にて観察した。

X. フィブリン同定のための蛍光抗体法

摘出した円盤表面の付着物を無蛍光スライドに塗布し、アセトン (4℃) にて5分間固定後、0.01M 磷酸緩衝食塩水 (pH 7.3) (phosphate-buffered saline, PBS) にて5倍希釈したフルオレセイン標識抗ラットフィブリノーゲンヤギ血清 (Serotec, Oxford, UK) を数滴加えて、湿潤箱内で37℃, 1時間反応させた。さらに PBS で過剰のフルオレセイン標識抗ラットフィブリノーゲンを洗い流し、蛍光顕微鏡 XF-EFD (日本光学, 東京) 下で観察した。また、蛍光の特異性を確認するためのブロッキングテストを行った。すなわち、スライドガラス上の塗沫標本にあらかじめ抗ラットフィブリノーゲンヤギ血清 (Serotec) を数滴加え、37℃, 1時間反応させた後に、PBS で洗浄後、前記の操作を行った。

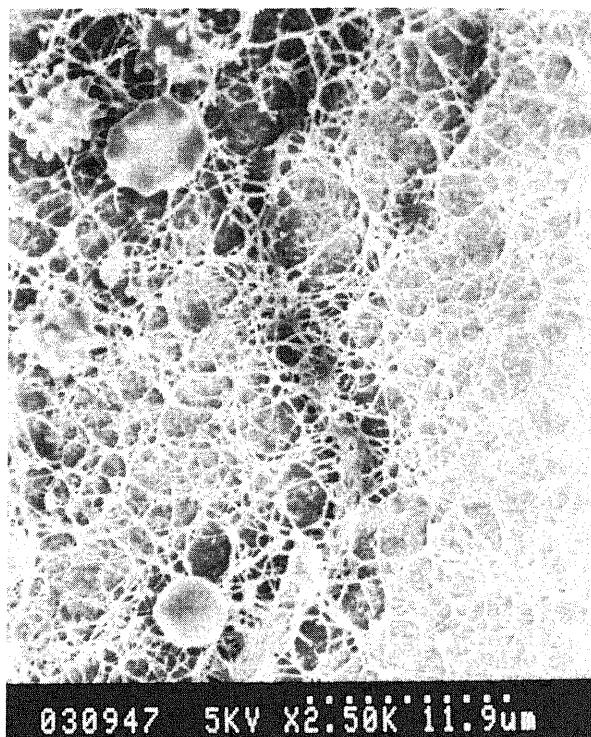
XI. 統計学的解析

統計学的解析には Fisher 直接確率計算法または Kruskal-Wallis 検定を用いた。

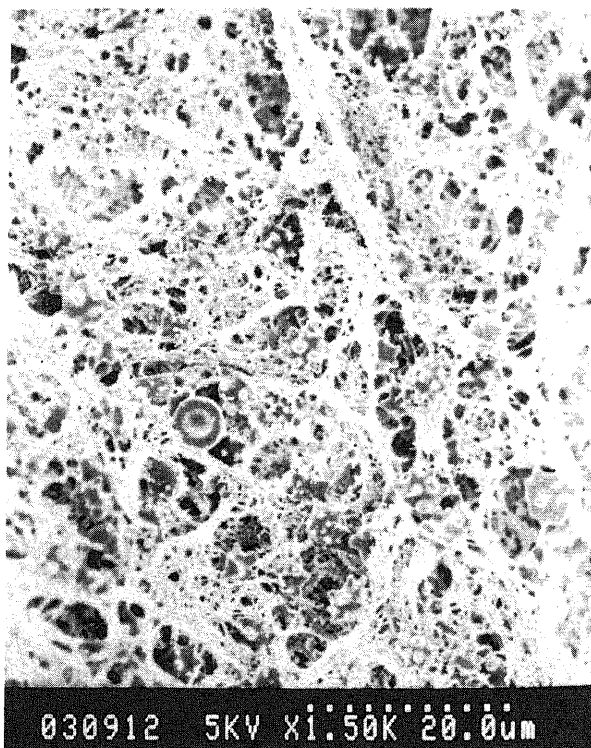
成 績

I. 走査型電子顕微鏡による円盤表面の観察

電顕用試料作成のための脱水、臨界点乾燥などの前処置をした使用前のラテックス円盤表面には、微小突起、微小列溝などが観察され、粗雑な表面構造を有していた。一方、デシケーター中で乾燥したのみで前処置をしなかった検体の表面構造はほぼ平滑であった。シリコン材料についても、前処置により表

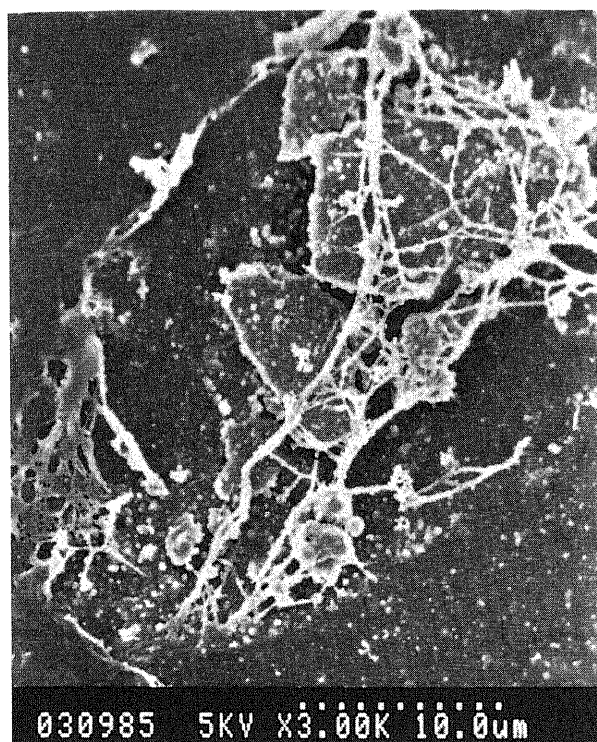


A

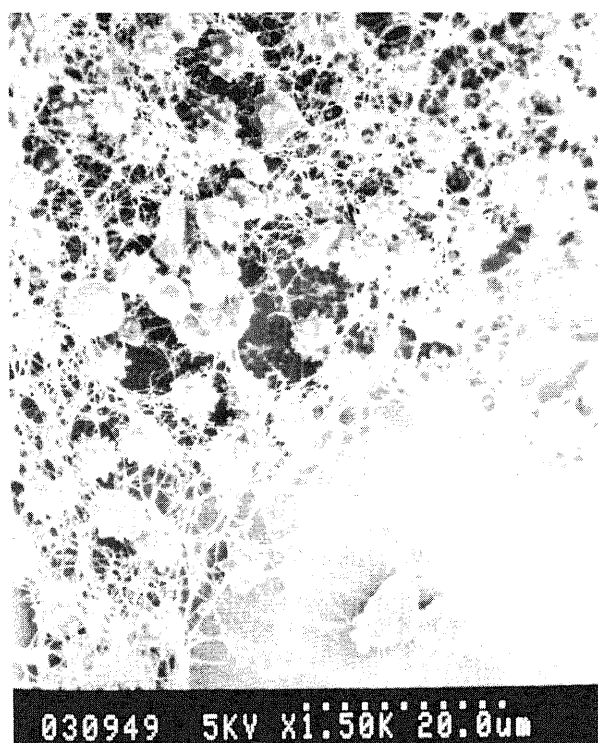


B

Fig. 1. Scanning electron micrographs of sterile latex disk 3 (A) and 5 days (B) after insertion. A ($\times 2,500$): fibrillar materials, amorphous crystals and erythrocytes are observed. B ($\times 1,500$): network or mesh fibrillar materials in association with crystals and erythrocytes but not microorganisms are observed.



A



B

Fig. 2. Scanning electron micrographs of sterile silicone disk 5 (A) and 7 days (B) after insertion. A ($\times 3,000$): fibrillar materials and crystals are observed. B ($\times 1,500$): network or mesh fibrillar materials in association with crystals and erythrocytes but not microorganisms are observed.

面の不整などの変化があるものの、その程度はラテックスに比し軽度であった。

1. 滅菌円盤

ラテックス滅菌円盤 (aseptic latex, La) 群では、円盤表面に、挿入1日後には少量の無定型な結晶の付着が大多数の検体で観察され、3日後には少量のフィブリン様物質の付着 (図 1A)、5日後にはこれらの物質の付着増加が認められた (図 1B)。7日後以降では、前述した所見が円盤全体に広がっていくのが、全検体で観察された。シリコン滅菌円盤 (aseptic silicone, Sa) 群およびポリビニール滅菌円盤 (aseptic polyvinyl, Pa) 群においては、3日後まではほとんど結晶成分の付着は観察されず、5日後になって、無定型な結晶とともにフィブリン様物質が付着し始め (図 2A)、7日後になると全検体においてフィブリン様物質および結晶の付着増加が円盤全体に観察された (図 2B)。ヘパリン徐放性ポリビニール滅菌円盤 (aseptic heparinized polyvinyl, HPa) 群では、7日後まではフィブリン様物質および結晶の付着は観察されず、14日後になって、円盤の一部に少量のフィブリン様物質および結晶の付着が観察された。

28日後でも、フィブリン様物質の付着は円盤表面の一部にとどまった (図 3)。なお、いずれのカテーテル材料表面においても、フィブリン様物質と絡みあうように血球成分の付着も観察された。

2. 菌塗布円盤

菌液を塗布したラテックス円盤 (bacterial latex, Lb) 群、シリコン円盤 (bacterial silicone, Sb) 群およびポリビニール円盤 (bacterial polyvinyl, Pb) 群では、円盤表面に、全検体において

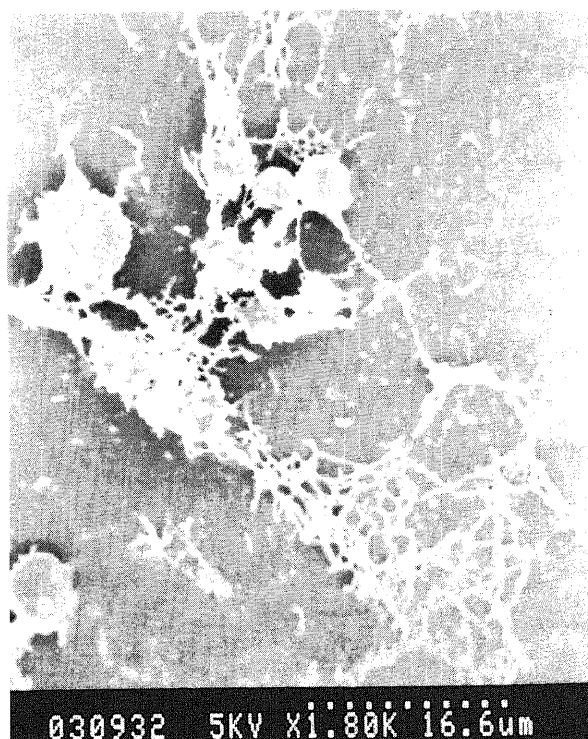


Fig. 3. Scanning electron micrograph of heparinized polyvinyl disk 28 days after insertion showing crystals and blood cells with little fibrillar materials ($\times 1,800$).

1日後より細菌および結晶成分が付着しはじめ, 3日後以降では全検体においてフィブリン様物質や結晶の中に細菌が埋め込まれる様な状態で存在し, いわゆるバイオフィルムを形成しているのが観察された(図4)。一方, ヘパリン徐放性ポリビニール菌塗布円盤 (bacterial heparinized polyvinyl, HPb) 群では,

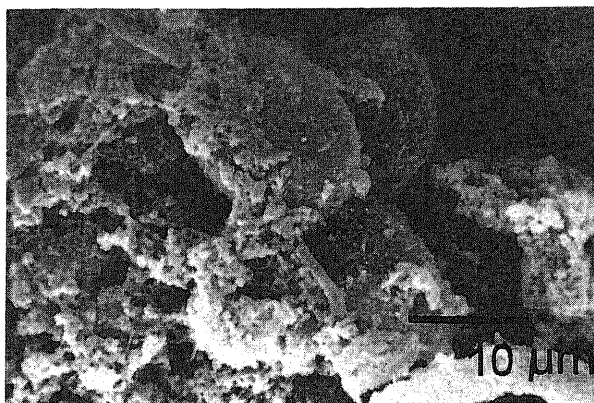


Fig. 4. Scanning electron micrograph of latex disk immersed in a cell suspension of *P. mirabilis* 3 days after insertion showing fibrillar materials in association with bacteria, leukocytes and crystals ($\times 4,000$).

円盤表面には, 1日後にはフィブリン様物質の付着は認められず, 3日後になって細菌およびフィブリン様物質の付着が, 大多数の検体において観察された。7日後以降では全検体において, バイオフィルム形成が観察された。

II. 蛍光抗体法によるフィブリンの同定



Fig. 5. Smear of incrustation around a disk treated with goat anti-rat fibrinogen serum showing specific immunofluorescence ($\times 400$).

Table 1. Number of rats with stone formed around the disk in each group

Group ^{a)}	Number of rats with stone on					
	1day	3days	5days	7days	14days	28days
La	0 (5) ^{b)}	0 (5)	1 (5)	2 (8)	5 (11)*	10 (13)*
Sa	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (9)	5 (11)*	9 (14)*
Pa	0 (5)	0 (5)	1 (5)	2 (8)	6 (11)*	10 (13)*
HPa	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	2 (10)	5 (15)
Lb	0 (5)	1 (5)	5 (5)	6 (6)	6 (6)	6 (6)
Sb	0 (5)	1 (5)	3 (6)	6 (6)	8 (8)	7 (7)
Pb	0 (5)	1 (5)	5 (5)	7 (7)	6 (6)	8 (8)
HPb	0 (5)	1 (5)	3 (6)	5 (5)	7 (7)	9 (9)

a) La, aseptic latex; Sa, aseptic silicone; Pa, aseptic polyvinyl; HPa, aseptic heparinized polyvinyl; Lb, bacterial latex; Sb, bacterial silicone; Pb, bacterial polyvinyl; HPb, bacterial heparinized polyvinyl.

b) Number of the rats examined.

* $p < 0.05$ compared to HPa group by Fisher's exact probability test.

Table 2. Weight of stone formed around the disk in each group

Group ^{a)}	Stone weight (mean \pm SD, mg) on				
	3days	5days	7days	14days	28days
La	0	5 (1) ^{b)}	6 \pm 4.0 (2)	41 \pm 24.5 (5)	59 \pm 43.5 (10)*
Sa	0	0	0	26 \pm 17.6 (5)	83 \pm 95.5 (9)*
Pa	0	5 (1)	7 \pm 2.5 (2)	44 \pm 16.5 (6)	76 \pm 62.2 (10)*
HPa	0	0	0	12 \pm 7.5 (2)	12 \pm 11.2 (5)
Lb	5 (1)	24 \pm 7.3 (5)	63 \pm 65.4 (6)	126 \pm 47.7 (6)	352 \pm 340.5 (6)**
Sb	5 (1)	32 \pm 17.0 (3)	46 \pm 25.4 (6)	98 \pm 41.4 (8)	206 \pm 65.3 (7)**
Pb	10 (1)	30 \pm 15.1 (5)	73 \pm 41.4 (7)	120 \pm 53.6 (6)	140 \pm 62.8 (8)**
HPb	5 (1)	18 \pm 7.3 (3)	49 \pm 20.2 (5)	63 \pm 22.7 (7)	77 \pm 34.4 (9)

a) Refer to the footnotes of Table 1.

b) Number of rats with stones.

* $p < 0.05$ compared to HPa group by Kruskal-Wallis test. ** $p < 0.05$ compared to HPb group by Kruskal-Wallis test.

塗沫標本には、羽毛状の形状を示すアップルグリーンの特異蛍光を示す物質が観察され(図5), これらは抗ラットフィブリノーゲン血清を用いたブロッッキングテストにて抑制されたことから、フィブリンと同定された。

Ⅲ. 材料別結石形成率および結石重量

1. 滅菌円盤

結石形成は、La 群においては、5 日後では 5 例中 1 例(20%), 7 日後では 8 例中 2 例(25%), 14 日後では 11 例中 5 例(45%), 28 日後には 13 例中 10 例(77%) に認められた。Sa 群においては、7 日後までは結石形成が認められず、14 日後に 11 例中 5 例(45%), 28 日後には 14 例中 9 例(64%) に、Pa 群においては、7 日後に 8 例中 2 例(25%), 14 日後に 11 例中 6 例(54%), 28 日後には 13 例中 10 例(77%) に、また、HPa 群では 7 日後までは認められず、14 日後に 10 例中 2 例(20%), 28 日後には 15 例中 5 例(33%) の結石形成が認められ、14 日後以降において他の 3 群に比し有意に低い結石形成率を示した(いずれも $p < 0.05$) (表 1)。結石重量については、HPa 群の重量が 28 日後において他の群より有意の低値を示した(いずれも $p < 0.05$) (表 2)。

2. 菌塗布円盤

結石形成は、Lb 群では、3 日後に 5 例中 1 例(20%), 5 日後以降は全例に認められた。Sb 群では、3 日後に 5 例中 1 例(20%), 5 日後に 6 例中 3 例(50%), 7 日後以降は全例に認められ、Pb 群では、3 日後に 5 例中 1 例(20%), 5 日後以降は全例に、また、HPb 群では、3 日後に 5 例中 1 例(20%), 5 日後には 6 例中 3 例(50%), 7 日後以降は全例に結石形成が認められた。結石形成率については、7 日後以降 4 群間に有意差は認められなかった(表 1)。結石重量については、HPb 群の重量が、28 日後において他の群より有意の低値を示した(いずれも $p < 0.05$) (表 2)。なお、菌塗布群の結石重量は滅菌群に比し明らかに大きく、いずれの材料間の比較においても有意の高値を示した。

Ⅳ. 尿 pH

菌塗布群の尿 pH は対照群に比し有意の高値を示した。滅菌群においても 3 日後以降は対照群の尿 pH に比し有意の高値を示した(いずれも $p < 0.05$) (表 3)。

Ⅴ. 結石成分

結石の主成分は、滅菌群、菌塗布群とも全例 MAP であった。

Ⅵ. 細菌学的検索

滅菌群においては、尿および結石培養ともにすべての検体で陰性であった。菌塗布群においては、尿および結石培養ともにすべての検体より *P. mirabilis* が分離され、他菌種は分離されなかった。

Ⅶ. 膀胱壁の病理組織学的検索

1. HE 染色

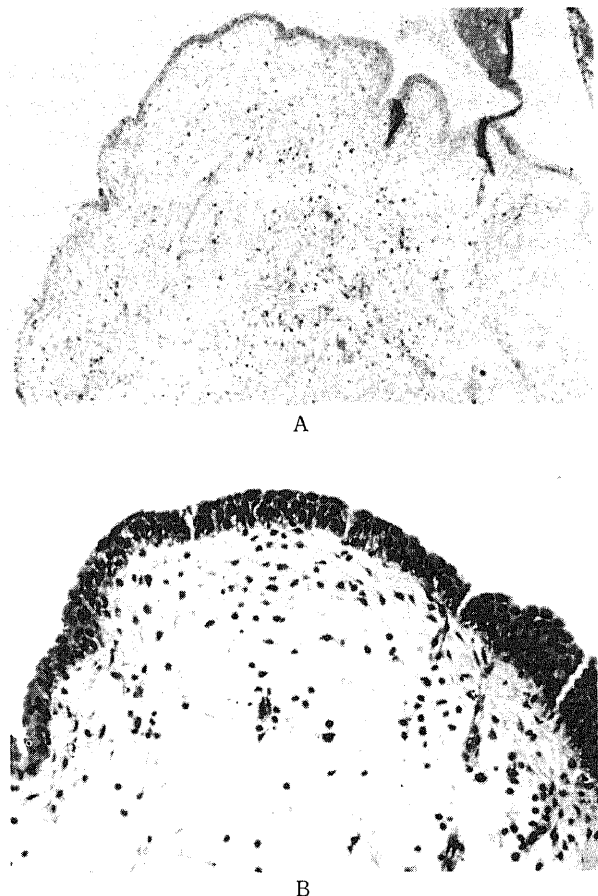


Fig. 6. Light micrographs of the bladder wall in sterile group 5 (A) and 14 days (B) after silicone disk insertion. A ($\times 250$): edema of submucosal layer is observed. B ($\times 400$): mucosal thickening with little inflammation is observed.

Table 3. Urine pH in each group

Group ^{a)}	Urine pH (mean \pm SD) on					
	1day	3days	5days	7days	14days	28days
La	5.7 \pm 0.01 (5)	6.7 \pm 0.01 (5) ^{ab}	6.6 \pm 0.17 (5)*	6.5 \pm 0.47 (9)*	6.4 \pm 0.45 (7)*	6.4 \pm 0.25 (10)*
Sa	5.7 \pm 0.13 (4)	6.7 \pm 0.18 (5)*	6.3 \pm 0.16 (5)*	6.6 \pm 0.27 (7)*	6.7 \pm 0.55 (8)*	6.8 \pm 0.45 (8)*
Pa	6.9 \pm 0.12 (6)*	7.0 \pm 0.10 (4)*	6.8 \pm 0.05 (5)*	6.7 \pm 0.06 (6)*	6.8 \pm 0.09 (8)*	6.8 \pm 0.04 (10)*
HPa	6.6 \pm 0.06 (5)*	7.0 \pm 0.01 (3)*	6.8 \pm 0.04 (5)*	6.7 \pm 0.06 (6)*	6.8 \pm 0.05 (7)*	7.0 \pm 0.15 (8)*
Lb	6.3 \pm 0.02 (5)*	6.3 \pm 0.09 (5)*	7.5 \pm 0.12 (4)*	7.3 \pm 0.12 (5)*	6.9 \pm 0.26 (7)*	7.6 \pm 0.50 (5)*
Sb	6.4 \pm 0.02 (5)*	6.2 \pm 0.09 (5)	7.1 \pm 1.02 (4)*	7.2 \pm 0.13 (5)*	7.3 \pm 0.22 (7)*	7.1 \pm 0.34 (8)*
Pb	6.9 \pm 0.05 (5)*	6.9 \pm 0.05 (4)*	6.9 \pm 0.03 (4)*	7.0 \pm 0.05 (6)*	7.0 \pm 0.06 (4)*	6.9 \pm 0.07 (6)*
HPb	6.6 \pm 0.06 (4)*	6.7 \pm 0.04 (4)*	6.9 \pm 0.06 (3)*	6.9 \pm 0.03 (4)*	6.9 \pm 0.08 (4)*	7.2 \pm 0.30 (6)*

Control group, untreated rats; urine pH 6.0 \pm 0.31 (n=10)

a) Refer to the footnotes of Table 1. b) Number of rats examined.

* $p < 0.05$ compared to control group by Kruskal-Wallis test.

1) 滅菌円盤群

用いた円盤材料の違いにかかわらず、膀胱粘膜の形態学的変化は同一であった。まず、円盤挿入5日後までは、粘膜下層の浮腫が最も著明であった(図6A)。7日後には、浮腫は軽減し、少量の好中球浸潤と粘膜上皮細胞の多層化が認められるようになり、14日後以降も同様な所見であった(図6B)。28日後には、粘膜上皮細胞の多層化と部分的な軽度のリンパ球浸潤が認められるに過ぎなかった。

2) 菌塗布円盤群

菌を塗布した各種円盤挿入に伴う膀胱粘膜の変化は、いずれも急性膀胱炎をへて上皮過形成とリンパ球浸潤を示す組織修復反応が認められた。すなわち、挿入3日後には、粘膜下浮腫、出血および多核白血球浸潤が認められ、5日後にもほぼ同様の変化が続いていた(図7A)。7日後には、粘膜下浮腫とともに粘膜上皮細胞は多層化し、14日後には浮腫の軽減、顕著な粘膜上皮細胞の多層化および好中球に代わってリンパ球の浸潤が認められた(図7B)。28日後には、粘膜上皮細胞の多層化を残すのみで、ほぼ滅菌円盤群の膀胱と同程度の病変を見るのみであった。

2. 膀胱壁のムチン層

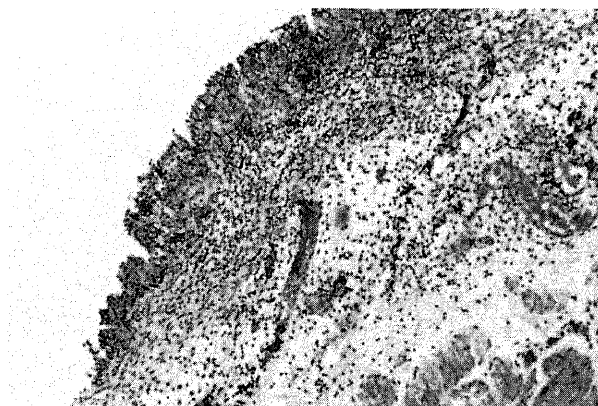
円盤挿入前には、膀胱粘膜上皮の外層に、青紫色に染まるム

チン層が認められた(図8)。挿入後には、滅菌円盤、菌塗布円盤の各群ともムチン層はほとんど消失し、いずれも28日後までの観察で再生は認められなかった(図9)。

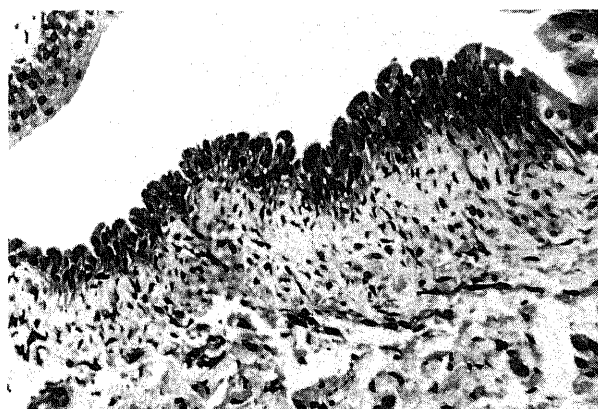
考 察

現在、尿路留置カテーテルの材料としてラテックスおよびシリコンが汎用されていることから、今回の実験はラテックスおよびシリコンを用いた。また、ヘパリン徐放性材料として、現在入手可能なポリビニール製のものを使用し、ポリビニール円盤はその対照として使用材料に加えた。臨床上、シリコンカテーテルは生体適合性が良好で、かつ表面構造が平滑であることより、長期留置が可能であるとする報告¹¹⁾¹²⁾が多い。カテーテル材料の表面構造の走査型電子顕微鏡による検索で、ラテックスがシリコンに比し明らかにその表面構造が粗雑であることがカテーテルの閉塞しやすい一因であるとする報告¹³⁾がある。しかし、著者らは、自然乾燥のみで観察したラテックス円盤表面は平滑であり、ラテックスは固定、脱水等の電子顕微鏡による観察のための前処置による表面構造の変化を強く受けることをすでに報告している¹⁴⁾¹⁵⁾が、今回の検索でも材料そのものの表面構造に両者間には大きな違いはないことを再確認した。

ラット膀胱内に挿入された各種円盤表面を走査型電子顕微鏡



A



B

Fig. 7. Light micrographs of the bladder wall in bacterial group 5 (A) and 14 days (B) after silicone disk insertion. A ($\times 250$): submucosal edema, bleeding and leukocytic infiltration are observed. B ($\times 400$): mild submucosal fibrosis and mucosal thickening with lymphocytic infiltration are observed.

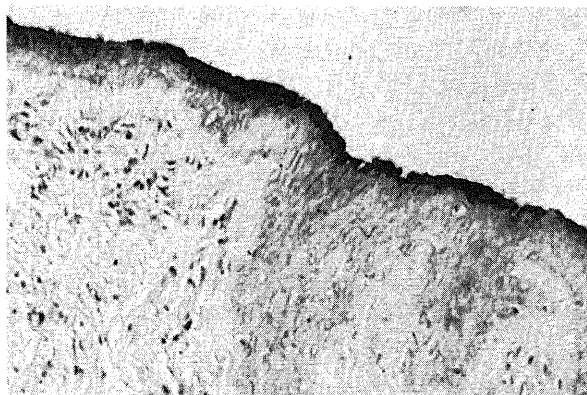


Fig. 8. Light micrograph of the untreated rat bladder wall stained with alcian blue. Positive staining of bright blue coloration is mainly confined to the mucin layer of superficial epithelium ($\times 200$).

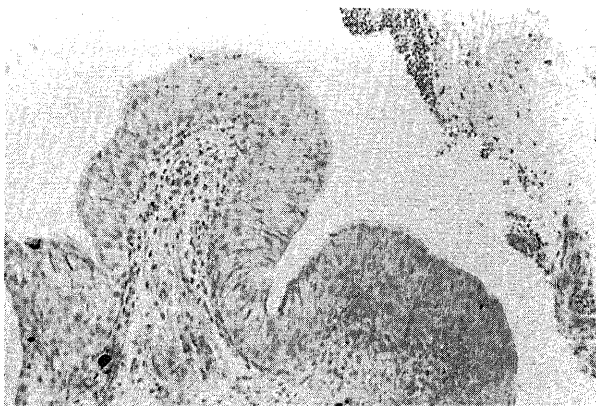


Fig. 9. Light micrograph of the bladder wall stained with alcian blue in sterile silicone group 14 days after insertion. Alcian blue-stainability of mucin layer disappears in the epithelium ($\times 400$).

で観察すると、滅菌群では、まず表面に少量の無定形な結晶成分が付着し、次いでラテックスでは3日後より、シリコンおよびポリビニールでは5日後よりフィブリン様物質が付着し始め、このフィブリン様物質の付着増加に伴い結晶、赤血球および白血球などの細胞成分の付着増加が認められた。このフィブリン様物質は、蛍光抗体法にて、その大部分がフィブリンであることが同定された。シリコンおよびポリビニール円盤ではフィブリンの付着時期がラテックス円盤より遅れる傾向にあったが、7日後以降は材料による差は認められなかった。菌塗布群においては、3日後よりフィブリン、白血球、細菌および結晶成分などが円盤表面に観察され、一部ではフィブリン網の中に結晶成分、細菌等が取り込まれたような形で観察された。以上の所見から、無菌状態においても円盤挿入に伴う膀胱粘膜損傷、および異物による膀胱粘膜の炎症反応などにより、フィブリンが炎症細胞とともに尿中に析出するものと考えられ、これに細菌感染が加われば当然のことながら炎症反応は増強し、フィブリンの析出量は多くなりカテーテルへの付着量も増加するものと考えられた。さらに、実験的にラット膀胱に化学的損傷を加えると、その損傷部はフィブリンにより被覆され、そのフィブリン網に結晶が付着しやすくなるとの報告¹⁸⁾もある。今回の検討で、菌塗布群のみならず無菌状態でも早期に円盤表面へのフィブリンの付着が認められ、結晶とともに円盤全体に広がっていくのが観察された。以上の所見は、結晶の円盤表面への付着に、フィブリンが一種の接着剤の役割を果たしていることを強く示唆している。一方、菌塗布群では早期よりフィブリンを含めた付着物が観察され、かつ時間の経過とともにその量は著明に増加し、これら付着物の中に細菌を埋め込む様な形で円盤上に広がっている状態、すなわちバイオフィルムの形成が観察された。Marrie ら¹⁷⁾¹⁸⁾、Nickel ら¹⁹⁾²⁰⁾はカテーテル表面のバイオフィルム形成に、表面に付着した細菌が産生するグリコカリックスを重要視しているが、尿路留置カテーテルにおいては、グリコカリックスのみならずフィブリンもその形成に重要な役割を果たしているものと考えられた。この早期のフィブリンの付着を阻害すれば、カテーテルへの付着物の量も減少させ得るとの仮定のもとに、ヘパリン徐放性材料の有用性について検討した。血管カテーテルの分野では、フィブリン塊による血管カテーテル内腔の閉塞を防ぐため、ヘパリン徐放性カテーテルの有用性が認められ、すでに臨床で応用されている²¹⁾²²⁾。このカテーテルは、0.01単位/cm²/min のヘパリンが徐放性にカテーテル表面より放出され、その放出量は時間の経過とともに徐々に減少するものの、約60日後でも0.001単位/cm²/min のヘパリン放出が認められている²¹⁾。今回の無菌状態での検討では、HPa 群の円盤表面へのフィブリンの付着量は明らかに減少し、その結果円盤表面の結石様付着物の重量も28日後で他の円盤より有意に低値を示した。菌塗布状態では、各材料間の結石形成率に有意差は認められなかったが、HPb 群の結石重量は他の円盤より有意に低値を示した。以上の成績より、ヘパリン徐放性材料はフィブリンの円盤表面への付着を阻害することにより、円盤表面の結石付着をも有意に減少させるものと考えられた。

ところで、留置カテーテルへの結晶の付着にウレアーゼ活性を有する尿素分解細菌が密接に関連していることが知られている。また、MAP や 燐酸カルシウム炭酸塩の結晶化には *P. mirabilis* を代表とする尿素分解細菌によるアンモニアの産生、

それに伴う尿のアルカリ化、さらに同時に産生された炭酸が関与しており、そのため、MAP および燐酸カルシウム炭酸塩を主成分とする結石は感染結石とも呼ばれている^{23)~25)}。今回の実験に用いた *P. mirabilis* は、教室の菅田⁹⁾、折戸²⁶⁾、中嶋²⁸⁾ がラットを用いた実験的上行性腎盂腎炎モデルに使用したのと同じ菌株で、33歳女子の両側腎臓型 MAP 結石患者尿中よりの臨床分離株で、いずれの実験でも MAP を主成分とする尿路結石の発症を認めている。また、菅田⁹⁾は、本菌株が強いウレアーゼ活性を有することを確認している。今回の実験でも、菌塗布群で高率に結石形成を認め、尿および結石中より *P. mirabilis* が検出され、かつ尿 pH のアルカリ化を伴っていた。この結果は、尿路留置カテーテル患者における尿素分解細菌による感染は、結石形成を促進することを示しているものといえよう。一方、量的には少ないものの滅菌群においても各種円盤表面に結石形成が認められ、これらの結石の成分はすべて MAP であった。Grenabo ら²⁸⁾は、実験的に膀胱壁のムチン層が消失すると、そこに MAP 結晶が付着しやすくなると報告し、また、異物が膀胱内にはいることにより、MAP 結晶が過飽和状態になるとする報告³⁰⁾や、上皮細胞内におけるウレアーゼの含有を示唆する論文³¹⁾もみられるが、その機序についての定まった見解はいまだ示されていない。今回の検討では、菌塗布群よりは軽度であるが滅菌円盤挿入群の尿 pH はアルカリ化の傾向を示していた。アルカリ化の原因として炎症による浸出液の混入などが考えられるが、今後さらに検討する必要がある。

膀胱壁のムチン層は、膀胱内に入った細菌を積極的に取り込み、細菌を取り込んだムチン層が膀胱粘膜より剥離し、それを洗い出し (wash out) 現象により膀胱外へ排出することにより感染防御をしているとの報告がある³²⁾。一方、ムチン層は細菌の付着を阻害することにより、感染防御をしているとの報告もある³³⁾³⁴⁾。いずれにしても、膀胱壁のムチン層の消失は、宿主側の局所的感染防御機能の低下につながるものと考えられている。ムチン層は、膀胱内異物などによる機械的な刺激および酢酸注入などによる化学的な刺激により、容易に剥離するとされており³³⁾³⁴⁾、異物挿入12時間後には消失していたとする報告³⁵⁾もある。今回の検討でも円盤挿入1日後には、ムチン層はほとんど消失し、円盤挿入期間中には再生像は認められなかった。円盤挿入という機械的操作および異物による機械的な刺激さらにはカテーテル材料にごく微量含まれているとされる化学物質の影響³⁶⁾も加わり、ムチン層が消失したものと考えられた。この結果は、临床上、尿路留置カテーテル患者の膀胱壁のムチン層も大きな影響を受けていることが予想され、このことが尿路留置患者に尿路感染症が高率に発症し、かつ難治性となる一因となっていることが考えられた。

円盤挿入中の膀胱壁の病理組織学的検討では、滅菌群において円盤の材料に関係なく、14日後以降は膀胱粘膜の多層化が主な所見であった。また、菌塗布群では、初期は急性炎症像を認めたが、14日後以降は滅菌群と同様に粘膜の多層化が主な所見であった。これらの結果は、円盤挿入による慢性刺激の結果生じた慢性炎症像と考えられた。

以上今回の研究結果をまとめると、尿路留置カテーテルに細菌および結晶様物質が付着する機序として、カテーテル表面への早期のフィブリン付着が、一つの重要な役割を果たしているものと考えられた。すなわち、フィブリンの付着により細菌および結晶の付着が容易となり、これに炎症細胞や脱落上皮細胞

なども付着し、さらに細菌の産生するグリコカリックスも加わってバイオフィルムが形成されるものと考えられた。また、カテーテルに付着した細菌がウレアーゼ活性を有すると、尿素の分解により産生されたアンモニアなどにより、カテーテル周囲に高率に結石が形成されるものと考えられた。Nickel ら³⁷⁾は、尿中でカテーテル表面に形成されたバイオフィルム中の細菌は、尿中に浮遊している細菌に比し、抗菌化学療法に抵抗性であることを報告しているが、このバイオフィルムの形成および細胞壁のムチン層の消失による膀胱壁の易感染性が、留置カテーテル患者における難治性尿路感染症発症の一要因と考えられた。また、カテーテル留置患者に発症した尿路感染症に対して抗菌化学療法が奏効した場合でも、しばしば短期間で再発する原因の一つとして、このバイオフィルム中の細菌が感染源になっている可能性が考えられた。

一方、ヘパリン徐放性材料はフィブリンのカテーテル表面への付着を阻害し、結石形成や細菌付着を減少させる可能性が大きい³⁸⁾こと、さらにヘパリンは膀胱壁のムチン層への保護作用もあるとされ、細菌の膀胱壁への付着を防ぐとの報告^{39)~41)}もみられることを考え合わせると、ヘパリン徐放性カテーテルの尿路留置カテーテルへの臨床的応用が期待される。

結 論

ウイスター系雌性ラットを用い、尿路留置カテーテルに細菌および結晶が付着する機序、およびその際の膀胱壁の変化を究明するため、カテーテル材料より作製した円盤を用いて検索し、以下の結果を得た。

1. カテーテル材料に関係なく早期に付着するフィブリンが結晶および細菌付着に重要な役割を果たし、これが結石やバイオフィルム形成と密接に関連していることが推察できた。
2. ヘパリン徐放性材料はフィブリンの付着を阻害し、細菌や結晶の付着を減少させるものと考えた。
3. バイオフィルム形成に加えて、円盤挿入により生じた膀胱の感染防御機構の一つとされる膀胱壁のムチン層の消失を、尿路留置カテーテル患者における難治性尿路感染症発症の一因として考えた。

謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導と御校閲を頂いた恩師久住治男教授に深く感謝の意を表します。また、本研究の遂行に当たり直接御指導頂いた大川光央助教授に感謝致すとともに、御指導頂いた本学病理学第一講座中西功夫教授、微生物学講座中村信一教授および衛生学講座橋本和夫教授に感謝致します。

さらに本研究に御協力頂いた現福井県済生会病院泌尿器科医長菅田敏明博士、当教室徳永周二講師、現石川県立中央病院泌尿器科医長中嶋孝夫博士ならびに教室員各位に感謝するとともに、走査型電子顕微鏡操作に御協力を惜しまれなかった土田貴夫技官、横田輝一技官および米田邦夫技官に感謝します。また、結石分析および光顕試料作成に御協力を頂いた田中耕一技官に感謝します。本論文の要旨は、第75回日本泌尿器科学会総会（新潟，1987）、第76回日本泌尿器科学会総会（盛岡，1988）、第77回日本泌尿器科学会総会（大阪，1989）、第38回日本化学療法学会総会（長崎，1990）および 22nd Congress of the International Society of Urology (Sevilla, Spain, 1991) において発表した。

なお、本研究成績の一部は、第2回老人医療基金の補助を受けたもので付記して謝意を表する。

文 献

- 1) Macfarlane, D. E.: Prevention and treatment of

catheter-associated urinary tract infections. *J. Infect.*, **10**, 96-106 (1985).

- 2) Burke, J. P., Garibaldi, R. A., Britt, M. R., Jacobson, J. A., Conti, M. & Alling, D. W.: Prevention of catheter-associated urinary tract infections. *Am. J. Med.*, **70**, 655-658 (1981).

- 3) Akiyama, H. & Okamoto, S.: Prophylaxis of indwelling urethral catheter infection: Clinical experience with a modified Foley catheter and drainage system. *J. Urol.*, **121**, 40-42 (1979).

- 4) Schaeffer, A. J., Story, K. O. & Johnson, S. M.: Effect of silver oxide/trichloroisocyanuric acid antimicrobial urinary drainage system on catheter-associated bacteriuria. *J. Urol.*, **139**, 69-73 (1988).

- 5) Warren, J. W., Muncie, H. L. Jr., Bergquist, E. J. & Hoopes, J. M.: Sequelae and management of urinary infection in the patient requiring chronic catheterization. *J. Urol.*, **125**, 1-8 (1981).

- 6) Platt, R., Polk, B. F., Murdock, B. & Rosner, B.: Mortality associated with nosocomial urinary-tract infection. *N. Engl. J. Med.*, **307**, 637-642 (1982).

- 7) Kunin, C. M., Chin, Q. F. & Chambers, S.: Formation of encrustation on indwelling urinary catheters in the elderly: A comparison of different types of catheter materials in "blockers" and "nonblockers". *J. Urol.*, **138**, 899-902 (1987).

- 8) Cox, A. J., Hukins, D. W. & Sutton, T. M.: Comparison of *in vitro* encrustation on silicone and hydrogel-coated catheters. *Brit. J. Urol.*, **61**, 156-161 (1988).

- 9) 菅田敏明: 腎盂腎炎および尿路結石発生に関する実験的研究. *日泌尿会誌*, **71**, 115-131 (1980).

- 10) 高崎悦司: 尿石の赤外線スペクトルによる分析. 第2編 定量的応用. *日泌尿会誌*, **51**, 639-663 (1960).

- 11) Srinivasan, V. & Clark, S. S.: Encrustation of catheter materials *in vitro*. *J. Urol.*, **108**, 473 (1972).

- 12) Ferrie, B. G., Groome, J., Sethia, B. & Kirk, D.: Comparison of silicone and latex catheters in the development of urethral stricture after cardiac surgery. *Brit. J. Urol.*, **58**, 549-550 (1986).

- 13) Axelsson, H., Schonebeck, J. & Winblad, B.: Surface structure of unused and used catheters: A scanning electron microscopic study. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, **11**, 283-287 (1977).

- 14) Ohkawa, M., Sugata, T., Sawaki, M., Nakashima, T., Fuse, H. & Hisazumi, H.: Bacterial and crystal adherence to the surfaces of indwelling urethral catheters. *J. Urol.*, **143**, 717-721 (1990).

- 15) Ohkawa, M.: Bacterial adherence to Foley urinary catheters. *Int. Urogynecol. J.*, **2**, 236-241 (1991).

- 16) Khan, S. R., Cockrell, C. A., Finlayson, B. & Hackett, R. I.: Crystal retention by injured urothelium of the rat urinary bladder. *J. Urol.*, **132**, 153-157 (1984).

- 17) Marrie, T. J. & Costerton, T. W.: A scanning electron microscopic study of urine droppers and urine

- collecting systems. Arch. Intern. Med., 143, 1135-1141 (1983).
- 18) Marrie, T. J. & Costerton, J. W.: Scanning electron microscopic study of uropathogen adherence to a plastic surface. Appl. Environ. Microbiol., 45, 1018-1024 (1983).
- 19) Nickel, J. C., Gristina, A. G. & Costerton, J. W.: Electron microscopic study of an infected Foley catheter. Can. J. Surg., 28, 50-52 (1985).
- 20) Nickel, J. C., Emtage, J. & Costerton, J. W.: Ultrastructural microbial ecology of infection-induced urinary stones. J. Urol., 133, 622-627 (1985).
- 21) Mori, Y., Nagaoka, S., Itoga, M., Tanzawa, H., Watanabe, H. & Idezuki, Y.: The effect of heparin release from a heparinized hydrophilic polymer (H-RSD) on antithrombogenicity. Artif. Organs, 2 (Suppl), 66-70 (1977).
- 22) Kido, D. K., Paulin, S., Aleghat, J. A., Waternaux, C. & Riley, W. D.: Thrombogenicity of heparin and non-heparin-coated catheters: Clinical trial. AJR., 139, 957-961 (1982).
- 23) Bruce, A. W., Sera, S. S., Clark, A. F. & Awad, S. A.: The problem of catheter encrustation. Can. Med. Assoc. J., 11, 238-241 (1974).
- 24) Griffith, D. P.: Struvite stones. Kidney Int., 13, 372-382 (1978).
- 25) Griffith, D. P., Musher, D. M. & Itin, C.: Urease. The primary cause of infection-induced urinary stones. Invest. Urol., 13, 346-350 (1976).
- 26) Griffith, D. P.: Infection-induced renal calculi. Kidney Int., 21, 422-430 (1982).
- 27) 折戸松男: *Proteus mirabilis* による腎盂腎炎の化学療法に関する実験的研究. 日泌尿会誌, 72, 680-693 (1981).
- 28) 中嶋孝夫: 実験的上行性腎盂腎炎. 光学顕微鏡, 走査型顕微鏡および透過型電子顕微鏡による観察. 日泌尿会誌, 75, 1359-1371 (1984).
- 29) Grenabo, L., Hedelin, H., Hugosson, J. & Pettersson, S.: Adherence of urease-induced crystals to rat bladder epithelium following acute infection with different uropathogenic microorganism. J. Urol., 140, 428-430 (1988).
- 30) Dalton, D. L., Hughes, J. & Glenn, J. F.: Foreign bodies and urinary stones. Urology, 6, 1-5 (1975).
- 31) Taylor-Robinson, D. & Addey, J. P.: Comparison of techniques for the isolation of T-strain mycoplasmas. Nature, 222, 274-275 (1969).
- 32) Balish, M. J., Jensen, J. & Uehling, D. T.: Bladder mucin: A scanning electron microscopic study in experimental cystitis. J. Urol., 128, 1060-1063 (1982).
- 33) Parsons, C. L., Greenspan, C., Moore, S. W. & Mulholland, S. G.: Role of surface mucin in primary antibacterial defense of bladder. Urology, 9, 48-52 (1977).
- 34) Davis, C. P. & Avots-Avotins, A. E.: Evaluation of bacterial attachment to acid treated bladder epithelium. Scan. Electron Microsc., 2, 825-830 (1982).
- 35) 福士泰夫, 折笠精一: 膀胱の感染防御機構の研究: 細菌の膀胱上皮内侵入過程の電顕像. 日泌尿会誌, 71, 92-103 (1980).
- 36) Wilkish, J., Vernon-Roberts, B., Garrett, R. & Smith, K.: The role of catheter surface morphology and extractable cytotoxic material in tissue reactions to urethral catheters. Brit. J. Urol., 55, 48-52 (1983).
- 37) Nickel, J. C., Ruseska, I., Wright, J. B. & Costerton, J. W.: Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cell growing as a biofilm on urinary catheter material. Antimicrob. Agents Chemother., 27, 619-624 (1985).
- 38) Ruggieri, M. R., Hanno, P. M. & Levin, R. M.: Reduction of bacterial adherence to catheter surface with heparin. J. Urol., 138, 423-426 (1987).
- 39) Parsons, C. L., Mulholland, S. G. & Anwar, H.: Antibacterial activity of bladder surface mucin duplicated by exogenous glycosaminoglycan (Heparin). Infect. Immun., 24, 552-557 (1979).
- 40) Ruggieri, M. R., Hanno, P. M., Samadzadeh, S., Johnson, E. W. & Levin, R. M.: Heparin inhibition of increased bacterial adherence following overdistention, ischemia and partial outlet obstruction of the rabbit urinary bladder. J. Urol., 136, 132-135 (1986).
- 41) Hanno, P. M., Fritz, B. S., Wein, A. J. & Mulholland, S. G.: Heparin as antibacterial agent in rabbit bladder. Urology, 12, 411-415 (1987).

An Experimental Study of Bacterial and Crystal Adherence to the Surfaces of Urinary Catheter Materials
Haruki Fuse, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., 101, 965—974 (1992)

Key words indwelling urinary catheter, bacterial and crystal adherence, fibrin, heparin, mucin layer

Abstract

The processes of bacterial and crystal adherence to the surfaces of urinary catheter materials and the histological changes of the bladder wall during material insertion were investigated in Wistar rats. An experimental model of an indwelling urinary catheter was produced by insertion of the disks (latex, silicone, polyvinyl or heparinized polyvinyl) 3 mm in diameter and 1 mm in thickness, into the bladder transvesically. These disks, sterile or immersed in a cell suspension of *Proteus mirabilis* isolated from a patient with renal infection stone, were extracted from the bladder 1, 3, 5, 7, 14 and 28 days after insertion. The surface of the disk was investigated bacteriologically and observed by scanning electron microscopy (SEM). To identify fibrin, the smear of the disk was examined by immunofluorescence method and the bladder wall was examined histologically, including alcian blue stain, for the mucin layer. SEM study showed that fibrillar materials adhered to the sterile latex 3 days, and to the sterile silicone and polyvinyl disks 5 days after insertion; increases in fibrillar materials were paralleled by increases in crystal adherence. However, a small amount of fibrillar material adhered to the sterile heparinized polyvinyl disk during the observation period. Immunofluorescence study showed most of the fibrillar material consisted of fibrin. The sterile heparinized material group showed a significantly decreased incidence of the stone formation and stone weight as compared with the other sterile material groups ($p < 0.05$). SEM study showed fibrin, bacteria and crystal adherence to the surface of each disk immersed in a cell suspension of *P. mirabilis*, which formed a biofilm. Histological examination of the bladder wall revealed the disappearance of the mucin layer during insertion of the disks. These results suggest that early adherence of fibrin to the surfaces of indwelling urinary catheter materials plays an important role in the development of bacterial and crystal adherence. Therefore, heparin inhibits the adherence of fibrin, resulting in decreased biofilm and stone formation on disks of the heparinized material. Additionally, it is thought that in addition to the biofilm formation, the disappearance of the mucin layer of the bladder wall may cause a predisposition to persistent catheter-associated urinary tract infection.